

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut
der Universität Marburg a.d. Lahn
Direktor: Professor Dr. P. Karlson

**Fettsäurespiegel
im braunen Fett des Meerschweins
während der frühen Postnatalentwicklung
und bei Kältebelastung**

**INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
in der gesamten Medizin
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität zu Marburg**

vorgelegt von
Lilli Schott, geb. Hannemann
aus Bad Hersfeld

1973

Marburg 1972

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut
der Universität Marburg a.d. Lahn
Direktor: Professor Dr. P. Karlson

**Fettsäurespiegel
im braunen Fett des Meerschweins
während der frühen Postnatalentwicklung
und bei Kältebelastung**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
in der gesamten Medizin
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität zu Marburg

vorgelegt von
Lilli Schott, geb. Hannemann
aus Bad Hersfeld

Marburg 1972



Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Marburg am 23.1. 1973

gedruckt mit Genehmigung der Fakultät

Dekan: Prof. Dr. Heinrich Oepen

Referent: Prof. Dr. Dr. H. J. Hohorst

Correferent: Prof. Dr. H. Kaffarnik

INHALTSÜBERSICHT

=====

	Seite
1. Einleitung und Problemstellung	1
2. Material und Methodik	5
3. Ergebnisse	18
4. Zusammenfassung	27
5. Diskussion	28
6. Literatur	31

Abkürzung:

BF-Mitochondrien: charakteristische Mitochondrien des braunen, plurivakuolären Fettgewebes (29).



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Einleitung und Problemstellung

Man hat schon früh beobachtet, daß menschliche Säuglinge kurz nach der Geburt anders als in späterem Lebensalter bei Kälteeinwirkung nicht oder nur kaum zittern (2). Die unter diesen Bedingungen zu beobachtende verstärkte Atmung, die bis zum dreifachen der bei neutraler Umgebungstemperatur gemessenen Werte gehen kann (2), läßt sich also nicht mit einer gesteigerten Muskelaktivität erklären. Vielmehr haben Untersuchungen von Brück (3, 4) gezeigt, daß die vermehrte Atmung auf einer zitterfreien, chemischen Wärmebildung (non shivering heat production) der Neugeborenen beruht, deren Sitz das sog. braune multiloculäre Fettgewebe ist (6).

Diese multiloculäre Fettgewebe - bei Winterschläfern auch als Winterschlafla drüse bezeichnet (Rasmussen 30) wurde inzwischen bei vielen Säugetieren als Organ der Chemothermogenese erkannt und in seiner Struktur und Funktion untersucht (34, 22).

Der Mechanismus der Chemothermogenese im multiloculären Fettgewebe läßt sich nach heutigem Wissen wie folgt skizzieren:

Kältebelastung führt über den Sympathikus zur Noradrenalin ausschüttung direkt in die stark mit sympathischen Nervenfasern versorgten multiloculären Fettzellen (9). Dort aktiviert das Catecholamin ein in der Zellmembran lokalisiertes Enzym Adenylatzyklase (37), welches aus Adenosin triphosphat den sog. "second messenger" der Hormonwirkung $3'$, $5'$ - Cyclo - adenosinmonophosphat freisetzt. Zyklisches Adenosinmonophosphat aktiviert Triglyceridlipasen (31), welche aus den Lipiddepots der multiloculären Fettzellen langkettige Fettsäuren freisetzen. Diese Fettsäuren sind die Hauptenergiequelle für die Wärmebildung in der multiloculären Fettzelle (21) und werden in den zahlreichen und besonders dicht mit Cristae ausgestatteten Mitochondrien (29) veratmet (12).

Da isolierte Mitochondrien aus multiloculärem Fettgewebe im Gegensatz zu Leber-, Herz- oder Skelettmuskel-Mitochondrien stets keine oder nur geringe Atmungskontrolle zeigten (18), ein Zeichen für eine mehr oder minder starke Entkopplung der Atmungskettenphosphorylierung, weisen die Mitochondrien aus multiloculären Fettzellen nicht nur eine beschleunigte Atmung auf, sondern auch eine geringere Ausbeute an Nutzenergie in Form von Adenosintriphosphat und entsprechend höheren Anteil an Wärme. Das ist in kurzen Zügen das Prinzip der Chemothermogenese in diesem dafür spezialisierten Gewebe.

Noch wenig Klarheit besteht aber über den Mechanismus der Entkopplung der Atmungskettenphosphorylierung in den Mitochondrien der multiloculären Fettzellen in vivo. Diese Frage ist Gegenstand zahlreicher neuerer Untersuchungen (8, 18, 23, 25, 26, 39).

Langkettige Fettsäuren unterscheiden sich von den bekannten "unphysiologischen" Entkopplern, wie Dinitrophenol, Dicumarol, CCCP = m-chloro-carbonyl-cyanidphenylhydrazon, dadurch, daß ihre entkoppelnde Wirkung in vitro zumindest partiell z.B. durch Hinzugabe von Albumin wieder aufgehoben werden kann (1, 15, 18, 20). Offenbar muß man auch für die Entkopplung der Atmungskettenphosphorylierung im braunen Fettgewebe unter in vivo-Bedingungen eine Reversibilität fordern, da, wie Brück in seinen Untersuchungen an neugeborenen Meerschweinchen zeigen konnte (4), Aussetzen der Kältebelastung zu einer schnellen Rückkehr der Atmung auf die Ausgangswerte führt. HOHORST und STRATMAN (36) und HOHORST und RAFAEL (18) konnten nun zeigen, daß Mitochondrien aus multiloculärem Fettgewebe nicht nur prinzipiell zur oxydativen Phosphorylierung fähig sind, was von verschiedenen Autoren bezweifelt worden war (21, 33), sondern konnten auch nachweisen, daß eine Entkopplung durch langkettige Fettsäuren und durch einen spezifischen, auf diesen Mitochondrientyp und auf die Entkopplung durch langkettige Fettsäuren beschränkten Rekopplungsmechanismus wieder aufgehoben werden kann (28).

Das braune Fettgewebe ist bei Meerschweinchen zum Überwiegenden Teil als trapezförmiger, gut vom übrigen Gewebe abgrenzbarer Lappen zwischen den Schulterblättern lokalisiert und daher leicht zu gewinnen. Schon in der ersten Woche nach der Geburt beginnt eine Umwandlung. Das läßt sich besonders deutlich an der Abnahme des Mitochondriengehaltes zeigen (27). Außerdem nimmt der Kopplungsgrad der oxydativen Phosphorylierung und die Atmungskontrolle, die bei Neugeborenen noch sehr gering sind, während dieser Umwandlung zu (27). Nach dem 20. Tag finden nur noch geringe Änderungen statt. Durch Kälteaufzucht bei $+ 8^{\circ} \text{C}$ läßt sich die Involution des interscapularen Fettkörpers aufhalten (40).

In dieser Arbeit wird versucht, die Rolle der Fettsäuren in Bezug auf den Kopplungsgrad der Atmungskettenphosphorylierung der Mitochondrien aus braunem Fettgewebe durch quantitative Untersuchungen näher aufzuklären.

Im einzelnen sollten dabei folgende Fragen beantwortet werden:

- 1) Wie hoch ist der Fettsäuregehalt des braunen Fettgewebes?
- 2) Ändert sich der Fettsäuregehalt des interscapularen Fettkörpers mit zunehmendem Alter der Tiere und dem damit verbundenen zunehmenden Ersatz der braunen Fettzellen durch weiße (5)?
- 3) Welchen Einfluß hat akute Kältebelastung bei Neugeborenen und 20 Tage alten Tieren auf den Fettsäuregehalt des interscapularen Fettkörpers?
- 4) Wie hoch ist der Fettsäuregehalt in BF-Mitochondrien?

- 5) Unterscheiden sich BF-Mitochondrien im Fettsäuregehalt von Lebermitochondrien?
- 6) Ändert sich die Fettsäurekonzentration der Mitochondrien mit dem Alter der Tiere?
- 7) Führt akute Kältebelastung der Tiere zu einer Änderung des Fettsäuregehaltes in den Mitochondrien?

Material und Methode:

I. Material:

Tiere

Für unsere Untersuchungen verwendeten wir den interscapularen Fettkörper von Meerschweinchen verschiedener Altersgruppen. Geschlechtliche Unterschiede blieben unberücksichtigt.

Die Aufzucht der Tiere erfolgte bei einer Temperatur von 20 bis 22 ° C, sie wurden mit "Altromin LS" Mischfutter der Fa. Altrogge, Lage in Westf., Heu und Wasser ad libitum ernährt.

Zur Lipidextraktion:

Chloroform p. A., Methanol p. A., Isopropanol p. A., n-Heptan p. A., Kieselgur gereinigt und gegläht von Merck AG, Darmstadt.

Zur Dünnschichtchromatographie:

Glasplatten 20 x 20 cm, Streichgerät, Glaskammern von der Fa. Desaga, Heidelberg; Kieselgel H nach Stahl von Merck AG, Darmstadt; Magnesiumsilikat zur Dc von H. Woelm, Eschwege; Natriumcarbonat p. A. von Riedel- de Haen AG, Seelze-Hannover.

Als Fließmittel:

Chloroform p. A., Methanol p. A., Butanol (2) p. A., Petroläther p. A., Petroleumbenzin p. A., Äther p. A., Essigsäure 99 - 100 % p. A. von Merck AG, Darmstadt.

Zur Fettsäurebestimmung:

Kuper (2)-nitrat krist. reinst, Triäthanolamin p. A., Natrium-diäthylthiocarbaminat p. A. von Merck AG, Darmstadt; Palmitinsäure 99 % (GC) von Carl Roth oHG, Karlsruhe-West; Ölsäure p. A. 99 % von Serva-Feinbiochemica GmbH & Co., Heidelberg.

Zur Mitochondrienisolation und Inkubations:

Saccharose reinst, Kaliumdihydrogenphosphat nach Sörensen, Magnesiumchlorid p. A., Titriplex^R III p. A. von Merck AG, Darmstadt; Triäthanolamin-Hydrochlorid von Boehringer, Mannheim GmbH; Rinderserumalbumin (95 %, Fraktion V, Amour) von Serva-Entwicklungslabor, Heidelberg.

Für Atmungsversuche an der Clark-Platin-Elektrode:

Adenosin-5-diphosphat, Adenosin-5-triphosphat, Ketoglutarensäure, Succinat von Boehringer, Mannheim GmbH.

II. Methodik

Methodik-Übersicht

1. Präparation des Gewebes
2. Lipid-Extraktion aus dem braunen Fettgewebe
3. Mitochondrienpräparation
4. Lipid-Extraktion aus BF-Mitochondrien mit Chloroform-Methanol
5. Lipidextraktion nach DOLE und MEINERTZ modifiziert
6. Reinigung und weitere Differenzierung des Extraktes
7. Dünnschichtchromatographische Lipidtrennung
8. Quantitative Bestimmung der Fettsäuren nach DUNCOMBE

Präparation des Gewebes

Im Tierstall wurden die Meerschweinchen durch einen Schlag auf den Nacken betäubt und nach dem Eröffnen der Karotiden ausgeblutet. Mit einem bis zum Kopf reichenden Längsschnitt wurde die Dorsalseite eröffnet und das Fell nach beiden Seiten geklappt. Anschließend wurde der interscapulare Fettkörper von bindegewebigen Haftungen und umgebenden Muskeln sorgfältig freipräpariert.

Akute Kältebelastung

Die Tiere wurden vor der oben beschriebenen Präparation für 20 bis 25 min. in den Kühlraum bei etwa $+ 4^{\circ} \text{C}$ gesetzt. Das braune Fettgewebe war nach dieser Kältebehandlung auffällig reich durchblutet.

Für die Mitochondrienpräparation wurde zur Erhöhung der Ausbeute zusätzlich das braune Fettgewebe, das perivaskulär um die großen Halsgefäße angeordnet ist, mitverwendet. Eingelagerte Lymphknoten wurden entfernt.

Lipid-Extraktion aus dem braunen Fettgewebe

Sollen die Lipide vollständig extrahiert werden, so müssen die Lipid-Eiweiß-Bindungen zerstört werden. Dies geschieht durch ein sowohl hydro- als auch lipophiles Lösungsmittel; Alkohole sind hierfür geeignet. Chloroform dient zur Extraktion der unpolaren und wenig polaren Lipide. Das Gemisch Chloroform-Methanol im Volumenverhältnis 2 : 1 wird heute am meisten verwandt (ZÖLLNER).

Sofort nach der Präparation wurde das Gewebe eines Tieres in mehrere grobe Stückchen zerschnitten und in einen 100 ml Rundkolben mit etwa 50 ml Chloroform-Methanol im Verhältnis 2 : 1 gegeben. Die Einwaage wurde durch Differenzwägung ermittelt. Beträge zwischen 1 und 2 g waren die Regel. Anschließend wurde im Wasserbad bei 60 ° C 4 Std. extrahiert, der Extrakt im Meßzylinder gesammelt und der Proteinrückstand noch einmal für 2 Std. mit der gleichen Menge Chloroform-Methanol nachextrahiert. Beide Extrakte wurden vereinigt, das Volumen gemessen und von einem kleinen Teil (0,1 ml) eine Lipidbestimmung durchgeführt (Differenzwägung eines Aluminiumschälchens vor und nach Eindampfen von 0,1 ml Extrakt).

Der Proteinrückstand wurde im Exsiccator getrocknet und gewogen. Er beträgt bei Neugeborenen 7 - 8 % des Frischgewichts und nimmt mit dem Alter der Tiere ab. Bei 20 - 25 Tage alten Meerschweinchen ist nur noch 3 % des Frischgewichts Protein.

Mittelchondrienpräparation aus braunem Fettgewebe (16)

Isolationspuffer (IP):	TRAP	10 ml
	EDTA	2 ml
	Saccharose	0,3 M
	pH	7,5

Das braune Fettgewebe von 3 bis 4 neugeborenen Meerschweinchen (0 bis 24 Std. alt) wurde sofort nach der Entnahme in eiskalten IP gegeben. Alle weiteren Arbeitsgänge wurden bei 0 ° C im Kühlraum ausgeführt. Zunächst zerkleinerten wir mit der Schere das Gewebe in sehr feine Stückchen. Das bluthaltige Medium wurde über ein Sieb verworfen und durch etwa 80 ml frisches Medium ersetzt. In einem Glas-Teflon Homogenisator nach POTTER und ELVEHJEM zerrieben wir die Stückchen vorsichtig bei Stufe 6, so daß kein Vakuum entstand. Das Fett verklumpte dabei.

Filtration über eine einfache Lage von Mull-Gaze befreite die Suspension von größeren Fettklumpchen. Durch nachfolgende Zentrifugation bei 8000 x g für 10 min. wurden die Zelltrümmer, Kerne und Mitochondrien abgefahren. Der Überstand wurde sorgfältig dekantiert. Um Verunreinigungen durch an den Rändern haftendes Fett zu vermeiden, wurde das Pellet mit einem Plümper in einen 30 ml Homogenisator mit 40 ml IP überführt und erneut bei Stufe 2 kurz aufgewirbelt.

Um einen Verlust der für das braune Fettgewebe typischen großen cristaereichen Mitochondrien zu vermeiden wurden die Kerne bei 600 x g abzentrifugiert. HOHORST und STRATMANN (36) konnten zeigen, daß bei 1000 x g Zentrifugation kleinere, runde cristaearme Mitochondrien angereichert werden, die im Enzymmuster und im elektronenmikroskopischen Bild den Mitochondrien aus weißem Fettgewebe entsprechen (29).

Der mitochondrienhaltige Überstand wurde über Gaze in neue Zentrifugengläser gegeben und für 10 min. bei 8000 x g zentrifugiert. Das Mitochondrienpellet wurde in 3 bis 5 ml IP aufgenommen und kurz im Homogenisator aufgewirbelt.

Wir verwendeten diese Mitochondriensuspension, deren Proteingehalt mit der Biuret-Methode nach WEICHSELBAUM (38) bestimmt wurde, für Atmungsversuche an der CLARK-Platin-Elektrode und zur Lipidextraktion mit nachfolgender Fettsäurebestimmung (s. u.).

Die Präparation von BF-Mitochondrien 20 Tage alter Tiere war wegen der geringeren Ausbeute aufwendiger. Wir benötigten für einen Versuchsgang Gewebe von 6 bis 8 Tieren. Zudem erschwerte das vermehrt verklumpende Fett das Homogenisieren, so daß in mehreren Arbeitsgängen nacheinander das Material zerkleinert werden mußte.

Lipidextraktion aus Mitochondrien mit Chloroform-Methanol (32)

Die Mitochondriensuspension mit bekanntem Proteingehalt wurde bei 8000 x g 10 min. zentrifugiert, der Überstand dekantiert und die an den Rändern des Zentrifugenglases anhaftenden Mediumtröpfchen mit einem Mulltupfer entfernt, um den Saccharosegehalt des Extraktes so gering wie möglich zu halten.

Das Mitochondrienpellet wurde mit etwa 40 ml Chloroform-Methanol (2 : 1) aufgewirbelt und für 1 bis 2 Std. stehengelassen. Anschließend homogenisierten wir die Suspension mit dem Glas-Teflon Homogenisator oder durch kurze Ultraschallbehandlung (3 bis 5 sec. auf Stufe 6 mit Branson Somic Power Sonifier).

Nach Zentrifugation (8000 x g für 5 min.) und Abgießen des Extraktes in ein Sammelgefäß wurde das Pellet neu in Chloroform-Methanol aufgewirbelt, homogenisiert und wieder zentrifugiert. Dieser Arbeitsgang wurde zur möglichst vollständigen Extraktion der Lipide noch ein drittes Mal wiederholt. Um einen wasserfreien Extrakt zu erhalten, wurden die gesammelten und vereinigten Extrakte in einem Vakuum-Rotationsverdampfer auf ein Volumen von 3 bis 5 ml eingeengt, mit 30 ml Methanol aufgefüllt und erneut einrotiert.

Zur weiteren Differenzierung mittels Dünnschichtchromatographie verdünnten wir den Extrakt mit Chloroform-Methanol auf 3 bis 5 ml, so daß der Lipidgehalt von 1 ml etwa 3 bis 6 mg betrug und die Lösung klar blieb.

Modifizierte Lipidextraktion aus Mitochondrien nach DOLÉ und
MEINERTZ (11)

Extraktionslösung: 40 Teile Isopropanol p. A.
10 Teile n-Heptan
1 Teil 1n H_2SO_4 aus Titrisol

Waschwasser: 0,05 % H_2SO_4

Adsorptionsmittel
für Phospholipide: Kieselgur gereinigt und gegläht

Zu 5 ml Extraktionslösung wurden je nach Proteingehalt 0,5 oder 1 ml Mitochondriensuspension tropfenweise dazugegeben. 4 bis 5 sec wurde die Suspension mit dem Ultraschallgerät bei Stufe 6 zerschallt, dann 10 min. lang bei 6000 U/min. zentrifugiert. Den Überstand gaben wir in ein 30 ml Schüttelglas, während das Pellet nochmals in der angegebenen Weise mit weiteren 5 ml Extraktionslösung aufgewirbelt und extrahiert wurde. Zur Phasentrennung wurde der gesammelte Extrakt mit 8 ml Heptan und 5 ml dest. Wasser versetzt und eine Minute lang kräftig geschüttelt. Nach wenigen Minuten hat sich die obere Heptanphase von der unteren Isopropanol-Wasserphase getrennt.

Die Phospholipide, die bei der colorimetrischen Fettsäurebestimmung stören, wurden durch Adsorption an Kieselgur eliminiert (7). Dazu heberten wir 9 ml der Heptanphase ab und versetzten sie mit 0,5 bis 1 g Kieselgur und 6 ml Waschwasser. Es folgte kräftiges Ausschütteln für 1 bis 2 min., dann Zentrifugation bei 600 U/min. 10 min. lang. Das Adsorptionsmittel setzte sich ab, darüber lag die Wasser- und zuoberst die gewaschene Heptanphase. 6 ml der Heptanphase wurden abgehebert und im Rotationsverdampfer bei + 30 ° C bis zur Trockne eingedampft. Der Lipidrückstand wurde in 3 ml Chloroform aufgenommen. Diese Lösung stellte die Ausgangslösung für die colorimetrische Fettsäurebestimmung nach DUNCOMBE (13) dar.

Vergleichsstandard und Blindwert

Bei jedem Versuch wurde eine Standardlösung (0,5 μ mol Palmitinsäure in 10 ml Extraktionslösung), die in gleicher Weise wie der DOLE-Extrakt behandelt wurde, mitbestimmt.

Als Blindwert diente reine DOLE-Extraktionslösung anstelle des Mitochondrienextraktes.

Reinigung und weitere Differenzierung des Lipidextraktes

Eine exakte, allerdings aufwendige Darstellung der verschiedenen Lipide ermöglicht uns die Dünnschichtchromatographie (DC). Im besonderen galt unser Interesse der Isolierung und quantitativen Bestimmung der unveresterten Fettsäuren.

Der Chloroform-Methanol-Extrakt aus braunem Fettgewebe muß bei DC-Auftrennung aller Lipide wegen des mengenmäßig weitaus Überwiegenden Triglyceridanteils vorbehandelt werden, um die Trennkapazität der Platten, bei der die freien Fettsäuren sichtbar werden, nicht zu überschreiten.

Vorreinigung (Precleaning):

Nach Eindampfen des Chloroform-Methanol-Extraktes im Vakuumrotationsverdampfer bei 30 ° C bis zur Trockne nahmen wir den Lipidrückstand in 36 ml 70 % Methanol auf. Mit frisch bereiteter gesättigter Natriumbicarbonat-Lösung wurde ein pH von 8,5 eingestellt, mit dem Ultraschallgerät eine milchige, stabile Suspension gebildet und 2 min. kräftig mit 50 ml Petroläther ausgeschüttelt. Nach kurzer Zentrifugation (3 bis 5 min.) bei 8000 U/min. wurde die obere triglyceridhaltige Petrolätherphase mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Die Trennschicht blieb unberührt. Noch zweimal wurde das Waschen mit Petroläther wiederholt.

Die Methanolphase wurde dann mit konz.HCl-Lösung angesäuert (pH 3) und bis zur Trockne eingedampft.

Nach Aufnahme des Lipidrückstandes in 10 ml Chloroform-Methanol wurde 1 ml davon weiter verdünnt bis zu einem Gehalt von etwa 5 mg Lipid pro ml Lösung. War wie für die Auftrennung nur der Neutralfette kein Pre-cleaning nötig, so wurde der eingedampfte Extrakt zweimal in je 20 ml Methanol aufgenommen und verdampft, um das Wasser zu entfernen. Der trübe Rückstand wurde dann in Chloroform-Methanol im Verhältnis 2 : 1 aufgenommen; denn in Chloroform allein sind die polaren Lipide schlechter löslich. Der Gehalt konnte bis zu 10 mg Lipid pro ml betragen.

Allgemeine Technik nach STAMM (35) zur Dünnschichtchromatographie

Beschichten der Glasplatten:

Für 5 Platten wurden 36 g Kieselgel H und 4 g Magnesiumsilikat mit einer 0,1 M Natriumkarbonatlösung (110 ml) im Mörtel fein verrührt und mit dem Streichgerät in einer gleichmäßigen Schicht von 0,25 mm auf die Platten gegossen. Diese wurden an der Luft getrocknet und vor dem Auftragen des Lipidextraktes bei 110 ° C im Trockenschrank aktiviert.

Das Fließmittel wurde 2 Std. bevor die Platten zum Lauf in die Kammer gestellt wurden, eingefüllt. Um eine vollständige Sättigung zu erzielen, wurde die Kammer allseitig mit Chromatographiepapier ausgekleidet und verschlossen. Die Umgebungstemperatur (18 bis 22 ° C) sollte von allen Seiten gleich sein, daher war Zugluft oder direkter Wärmestrom zu meiden.

Auftragen des Lipidextraktes:

Bei zweidimensionalem Lauf wurde der Extrakt (0,1 bis 0,2 ml) am rechten unteren Rand 2 cm von den Kanten entfernt punktförmig aufgetragen. Es war darauf zu achten, daß die Kieselgelschicht von der Pipette unberührt blieb.

Bei eindimensionalen Lauf konnten 4 bis 6 Proben auf einer Platte aufgetrennt werden. Dazu trugen wir 0,05 bis 0,1 ml Extrakt 2 cm vom unteren Rand entfernt in einer möglichst feinen und gleichmäßigen 1 bis 2 cm langen Strich auf die aktivierte und abgedühlte Platte auf. Das geschah durch dichtes ineinanderreihen kleiner Tröpfchen. Zwischen den einzelnen Proben blieb ein Abstand von 1 cm.

Fließmittelgemische:

Zur zweidimensionalen Auftrennung aller Mitochondrienlipide modifiziert nach ROUSER und FLETCHER (32)

Fließmittelgemisch 1: Chloroform-Methanol-Wasser wie 65 : 25 : 4
für die vertikale Laufrichtung

Fließmittelgemisch 2: Butanol-Acessig-Wasser wie 60 : 40 : 5
für den horizontalen Lauf

Nach 50 bis 60 min. hatte das erste Fließmittelgemisch den oberen Plattenrand erreicht. Die Platte wurde herausgenommen, an der Luft 10 min. getrocknet und um 90° im Uhrzeigersinn gedreht in die nächste Kammer mit Fließmittelgemisch 2 gestellt. Hier war die Laufgeschwindigkeit erheblich langsamer. In 4 Std. hatte die Front den oberen Rand erreicht.

Mit diesen Fließmitteln war eine saubere Trennung sowohl der unpolaren als auch der polaren Lipide zu erzielen. Weil man mit dieser Methode nur eine Probe auftrennen konnte, waren mehrere Platten nötig, um eine gut meßbare Menge an Fettsäuren zu gewinnen. Wir versuchten 4 Platten in einem speziell dafür hergestellten Trog gleichzeitig zu entwickeln. Leider war aufgrund der Wirbelbildungen der Gasmische in der gesättigten Kammer keine gute Auftrennung zu erzielen. Daher versuchten wir die eindimensionale Trennung. Wir ließen die Platten in beiden Fließmittelgemischen nacheinander in der gleichen Richtung laufen. Die besten Ergebnisse wurden erreicht, wenn das erste Fließmittelgemisch bis zum oberen Plattenrand, das zweite bis 2 cm darunter läuft.

Mit der eindimensionalen Trennung konnten 4 bis 6 Proben und eine Standard-Fettsäure zugleich aufgetragen werden. Als Standard eignete sich wegen der guten Anfärbbarkeit mit Joddampf Ölsäure besonders gut.

Auftrennung der Neutralfette:

Einfacher und schneller war die Auftrennung nur der Neutralfette. Die Fettsäuren werden in diesem Fall mit zu dieser Gruppe gerechnet. Die Phospholipide, die bei der späteren colorimetrischen Bestimmung der Fettsäuren störend interferieren blieben am Start liegen.

Diese Methode wurde von KELLY (10) angegeben. Sie führte ebenso gut zu dem gewünschten Ziel der Isolierung der Fettsäuren von allen anderen Lipiden.

Darstellung der aufgetrennten Lipide:

Zum Sichtbarmachen der Flecken verwendeten wir drei verschiedene Reagenzien:

1. Schwefelsäurebichromat;

Dabei färbten sich alle Flecken beim Veraschen (30 min. bei 180 ° C) braun bis schwarz an.

2. Phosphorsprühareagenz nach DITMER und LESTER (10);

dabei wurden Phospholipide nach wenigen Minuten blau getönt. Eine genaue quantitative Bestimmung war nach diesen Behandlungen nicht mehr möglich. Bei der Entwicklung und Erprobung der verschiedenen Fließmittel fanden diese Reagenzien Anwendung. War die bestmögliche Trennmethode ausgearbeitet, so wurden die Platten in

3. Joddampf gestellt.

Organische Substanzen färbten sich je nach Intensität der Jodeinwirkung gelb bis braun. Da die Anfärbung bald abbläute, punktierten wir die Fleckenränder mit einer Spachtelspitze zur Markierung.

Eluierung der Fettsäuren von der Chromatographieplatte:

Nach Entwickeln des Chromatogramms in der Jodkammer wurde das Kieselgel des markierten Fettsäureflecks von der Platte gerabzt und die Fettsäure durch kräftiges Ausschütteln des Pulvers mit 3 ml Chloroform extrahiert. Nach Zentrifugation und Dekantieren des fettsäurehaltigen Überstandes wiederholten wir diese Extraktion noch zwei Mal. Die vereinigten Extrakte wurden je nach Fettsäuregehalt auf ein Volumen von 2 bis 4 ml unter Stickstoffstrom eingeengt. Dieser Chloroformextrakt war die Ausgangslösung für die Fettsäurebestimmung nach JENCOMBE (13).

Quantitative Bestimmung der Fettsäuren nach JENCOMBE (13)

Irinzin:

Die fettsäurehaltige Chloroformlösung wird mit einer wässrigen Kupfersalzlösung ausgeschüttelt, dabei löst sich ein den Fettsäuren entsprechender Teil der Kupferionen in der Chloroformphase als Kupfersalz der Fettsäuren. Mit Diäthylthiocarbaminat als Natriumsalz, einem Reagenz auf Kupferionen, wird in der Chloroformphase ein Farbkomplex gebildet, dessen Intensität der Menge der vorhandenen Kupferionen und damit dem Gehalt der Fettsäuren proportional ist.

Die Farbintensität wird im Photometer (BECKMAN) bei 440 nm gemessen. Die Ausführung erfolgt anhand der Vorschrift. Die Eichkurven mit Fettsäuren verschiedener Kettenlänge (Palmitinsäure, Ölsäure, Stearinsäure, Decansäure) stimmten in den Extinktionen mit den Werten in der Originalarbeit überein.

Am meisten Sorgfalt erforderte die Trennung der Chloroformphase von der darüberstehenden Kupfersalzlösung. Es hatte sich daher das zusätzliche Filtrieren der Chloroformphase nach der Zentrifugation mit anschließendem Absaugen der Wasserphase bewährt.

Ergebnisse:

=====

Die Umwandlung des interscapularen Fettkörpers des Meerschweinchens vom braunen zum weißen Fettgewebe in den ersten drei Wochen nach der Geburt bei Wärmeaufzucht ($22 - 25^{\circ}\text{C}$) ging mit einer Verminderung des Fettsäuregehaltes von $5,1 \mu\text{mol pro g}$ Frischgewicht bei Neugeborenen auf $3,2 \mu\text{mol pro g}$ bei 20 Tage alten Tieren einher (siehe Abb. 1 W).

Akute Kältebelastung (K) (Siehe Methodik) führte bei 20 Tage alten Tieren zu einer Steigerung des Fettsäurespiegels von $3,2 \mu\text{mol pro g}$ um mehr als das Doppelte auf $7,0 \mu\text{mol pro g}$. Makroskopisch fiel bei der Präparation nach dieser Kälteereizung eine deutlich vermehrte Durchblutung des Fettkörpers auf. Bei neugeborenen Tieren dagegen führt die gleiche Kältebehandlung zu keiner Erhöhung des Fettsäurespiegels im Gewebe (Siehe Abb. 1).

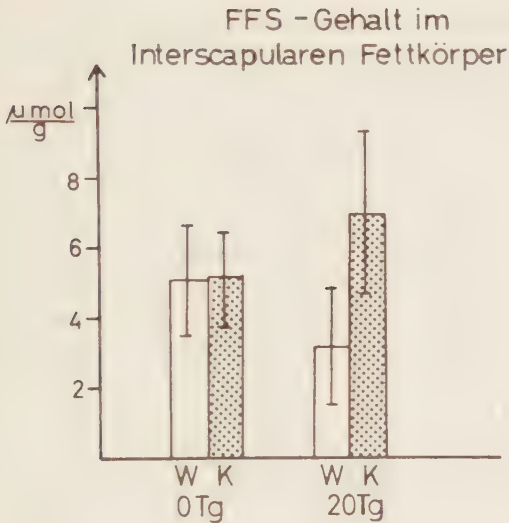


Abb. 1: Fettsäurespiegel des interscapularen Fettkörpers neugeborener (0 Tg) und 20 Tage alter Meerschweinchen in μmol pro g Frischgewicht bei Wärmeaufzucht ($22 - 25^\circ \text{C}$).
K = 20 min. Aufenthalt bei $+4^\circ \text{C}$ vor der Gewebepräparation
W = ohne akute Kältebelastung

Nach Lipidextraktion mit Chloroform-Methanol (2 : 1) und Reinigung des Extraktes mit der modifizierten DOLE-Methode (12) zur Elimination der Phospholipide wurden die langkettigen Fettsäuren colorimetrisch nach DUNCOMBE (13) bestimmt (siehe Tab. 1).

Die dargestellten Werte sind Mittelwerte aus 5 bis 7 Doppelbestimmungen an einem Gewebsextrakt von je 1 - 3 g Fettgewebe.

Tab. 1: Fettsäuregehalte in $\mu\text{mol pro g}$ Frischgewicht im interscapularen Fettkörper bei Meerschweinchen verschiedener Altersgruppen und nach akuter Kältebelastung.

<u>0 Tage</u>			<u>20 Tage</u>		
Vers. Nr.	Wärme	Kälte	Vers. Nr.	Wärme	Kälte
1	4,3	4,0	1	6,0	7,0
2	-	5,8	2	4,1	10,0
3	6,8	5,6	3	3,8	9,8
4	3,2	4,0	4	1,2	3,1
5	6,1	6,8	5	2,4	5,6
			6	1,6	5,6
			7	3,2	8,3
n	4	5		7	7
x	5,1	5,2		3,2	7,0
s	1,6	1,2		1,7	2,4

Wärme: Die Präparation des Gewebes erfolgte im Tierstall bei etwa 25°C .

Kälte: Vor der Präparation wurden die Tiere einer Kältebelastung (20 min. bei $+ 4^{\circ}\text{C}$) ausgesetzt.

Jede Versuchsnummer entspricht einer Doppelbestimmung an einem Fettgewebs-extrakt von 1 - 3 g Frischgewicht.

Während der Wärmeinvolation in der 1. postnatalen Phase sank der Mitochondrien-gehalt des interscapularen Fettkörpers ab. Darüber hinaus änderten sich auch funktionelle Eigenschaften der Mitochondrien. Dies zeigten einige Atmungsversuche an der Clark-Platin-Elektrode mit BF-Mitochondrien neugeborener und 20 Tage alter Meerschweinchen:

Mitochondrien von Neonaten zeigten auch nach Isolation in zweiprozentigem Albuminpuffer keine Atmungskontrolle, d. h. ADP-Zugabe führte zu keiner Atmungsbeschleunigung. Der Sauerstoffverbrauch bei 2-Oxoglutarat-Atmung lag bei 108 nAtom $O_2/2$ pro mg Mitochondrienprotein pro min. Als Vergleichswert fanden wir bei Lebermitochondrien der erwachsenen Ratte nur 28 nAtom $O_2/2$ pro mg Protein pro min.

Die Atmungskettenkopplierung der Mitochondrien war stark entkoppelt, der P : O-Wert war nicht meßbar. Sie ließ sich aber durch GDP-Zugabe wieder rekoppeln. Das hatte zur Folge, daß die 2-Oxoglutarat-Atmung verlangsamt wurde und ADP-Zugabe zu einer Atmungsbeschleunigung führte. Der P : O-Wert lag nach Rekopplung bei 2-Oxoglutarat-Atmung im Mittel aus 4 Versuchen bei 2,1.

Bei 20 Tage alten, in Wärme aufgezogenen Tieren fanden wir dagegen auch ohne GDP-Zugabe eine gekoppelte Atmung. Der P : O-Wert lag bei 2-Oxoglutarat-Atmung bei 2,6 (Mittelwert aus 2 Versuchen), und bei Succinat-Atmung bei 1,45.

Ein Beispiel eines solchen Versuchs zeigt Abb. 2 A:

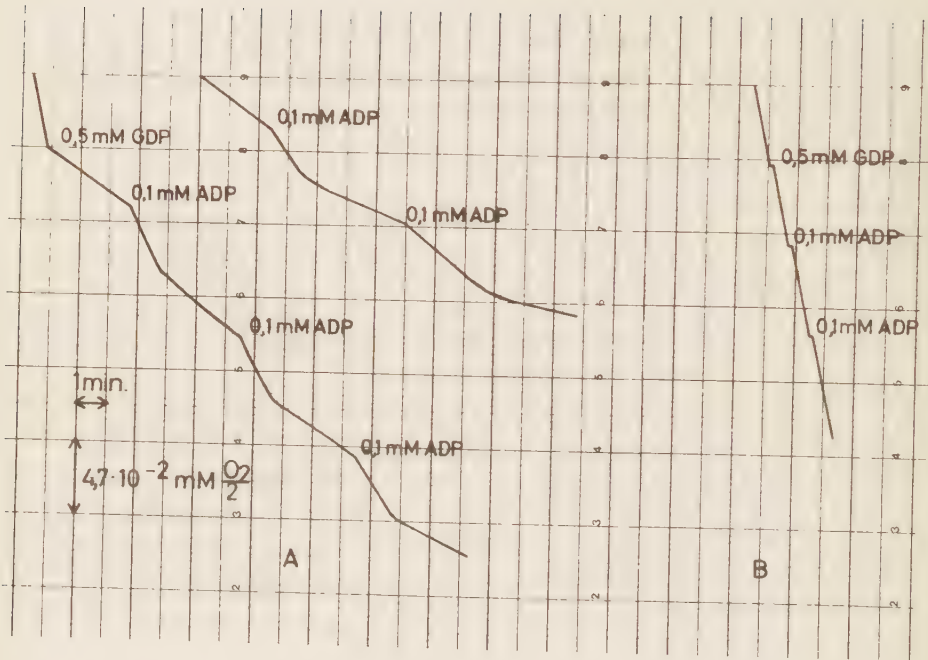


Abb. 2: Atmungskontrolle in Mitochondrien des interscapularen Fettkörpers gemessen mit der Clark-Platin-Elektrode nach ESTABROOK (14).

A: nach Mitochondrienisolation in 2 % Albuminpuffer

B: nach Mitochondrienisolation in albuminfreiem Puffer

Die Inkubationstemperatur betrug 25°C . Das Inkubationsmedium enthält:
20 mM Triäthanolamin/HCl, pH 7,2; 2 mM EDTA; 0,3 M Saccharose; 2 mM
Magnesiumchlorid; 5 mM Kaliumphosphat; 6 mM 2-Oxoglutarat.

GDP wurde in einer Konzentration von 1 mM ins Inkubat gegeben. Der Protein-
gehalt schwankte zwischen 0,1 bis 0,5 mg/ml.

Wurden die Mitochondrien in albuminfreiem Puffer isoliert, um den in vivo
vorhandenen Zustand durch das Abfangen der freien Fettsäuren nicht zu ver-
fälschen, so ließ sich die entkoppelte Atmung auch durch GDP-Zugabe nicht
wieder rekoppeln (siehe Abb. 2 B).

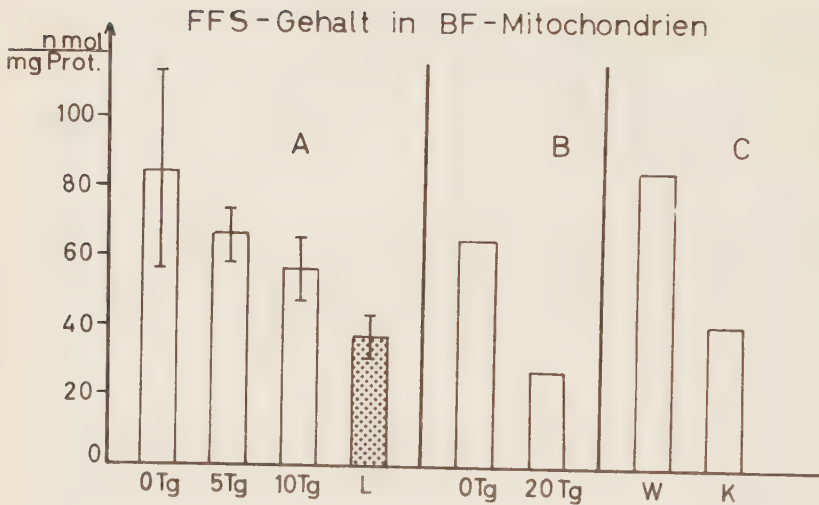


Abb. 3: Fettsäuregehalt in Mitochondrien des interscapularen Fettkörpers bei Meerschweinchen (DUNCORBE positive, langkettige Fettsäuren)

- A: in Abhängigkeit vom Alter der Tiere (0 - 10 Tage) und im Vergleich zu Lebermitochondrien der erwachsenen Ratte (L).
- B: beim Vergleich von Neugeborenen und 20 Tage alten Tieren nach Isolation in albuminhaltigem Puffer. Die Lipidextraktion erfolgt mit der modifizierten Dole-Methode (V). Einzelheiten siehe Methodik.
- C: ohne (W) und nach akuter Kältebelastung (K) bei Neugeborenen.

Die Mitochondrien aus Abb. 3 A und 3 C wurden in albuminfreiem Puffer isoliert. Nach Chloroform-Methanol (2 : 1) Extraktion der Lipide und DC-Trennung wurden die langkettigen Fettsäuren colorimetrisch nach DUNCOMBE (13) bestimmt.

Wie wir oben sahen, nahm der Fettsäuregehalt des braunen Fettgewebes bei Wärmeaufzucht in den ersten drei Wochen nach der Geburt ab. Auch die funktionellen Eigenschaften der Mitochondrien dieses Gewebes änderten sich (siehe oben). Damit verbunden fanden wir eine Abnahme des Fettsäurespiegels in den Mitochondrien. Abb. 3 A zeigt die Änderung des Fettsäuregehaltes der BF-Mitochondrien in Abhängigkeit vom Alter der Tiere und im Vergleich zu Lebermitochondrien. Mit abnehmendem Fettsäuregehalt in den Mitochondrien geht eine zunehmende Fähigkeit zur oxydativen Phosphorylierung einher.

Isolation der Mitochondrien bei Neugeborenen: in zweiprozentigem Albuminpuffer, wie sie für die Atmungsversuche durchgeführt wurde, hatte eine Abnahme des Fettsäuregehaltes der Mitochondrien von 84 nmol pro mg Protein auf 64 nmol pro mg Prot. (Mittelwert aus drei Versuchen), also um etwa 25 % zur Folge.

Auch bei dieser Isolation ist die Altersabhängigkeit im Fettsäuregehalt deutlich. Von 64 nmol pro mg Protein fällt der Wert auf 27 nmol pro mg Protein bei 20 Tage alten Tieren ab (Mittelwert aus jeweils drei Versuchen). Vergleiche Abb. 3 B!

Den Einfluß akuter Kältebelastung auf den Fettsäuregehalt des interscapularen Fettkörpers haben wir oben betrachtet. Die Frage ist, wie sich eine derartige Behandlung auf den Fettsäuregehalt in den Mitochondrien auswirkt. Wie Abb. 3 C zeigt, sinkt der Fettsäuregehalt von BF-Mitochondrien Neugeborener auf die Hälfte von 84,2 nmol pro mg Protein auf 40,5 nmol pro mg Protein ab. Dieser Abfall könnte sich auf eine verstärkte Fettsäureveratmung zurückführen lassen.

Weil auch diese Mitochondrien keine gekoppelte Atmung zeigen, läßt sich vermuten, daß der Grad der Entkopplung nicht allein vom Fettsäuregehalt in den Mitochondrien abhängig ist.

Tabelle 2: Fettsäuregehalte in Mitochondrien des interscapularen Fettkörpers bei zunehmendem Alter der Tiere

Versuch Nr.	0 Tg	5 Tg	7 Tg	10 Tg
1	103,7	71,0	57,0	64,4
2	64,6	61,1	46,8	58,6
3	55,6	70,0	73,0	45,5
4	112,5			
5	68,9			
6	123,2			
7	60,7			
n	= 7	3	3	3
x	= 84,2	67,3	59,0	56,1
s	= 28	7		9,7

In den beiden ersten Altersgruppen (0 Tage und 5 Tage) stellt jeder Wert (in nmol pro mg Mitochondrienprotein) einen Mittelwert aus 3 - 6 Bestimmungen eines Versuchs mit Gewebe von 3 - 4 Tieren dar. Weil der Mitochondriengehalt des interscapularen Fettkörpers mit zunehmendem Alter der Tiere abfällt, mußten wir für die beiden letzten Altersgruppen (7 Tage und 10 Tage) Gewebe von 4 - 6 Tieren verwenden. Hier sind Einzelwerte von drei Bestimmungen eines Versuchs angegeben (Einzelheiten siehe Methodik).

Zusammenfassung

=====

Der Gehalt an unveresterten Fettsäuren wurde im interscapularen Fettkörper und in den Mitochondrien dieses Gewebes bei neugeborenen Meerschweinchen und während der ersten Postnatalperiode bei Aufzucht in neutraler Umgebungstemperatur und nach Kältebelastung untersucht.

Zeitlich parallel mit dem Ersatz der plurivakuolären, "braunen" Fettzellen durch univakuoläre, "weiße" Fettzellen bei Wärmeaufzucht sinkt der Fettsäuregehalt des interscapularen Fettkörpers auf etwa 60 % des Ausgangswertes bei Geburt.

Während derselben Zeit sinkt auch der Fettsäuregehalt der isolierten Mitochondrien des interscapularen Fettkörpers, während umgekehrt oxydative Phosphorylierung und Atmungskontrolle ansteigen.

Akute Kältebelastung bleibt bei neugeborenen Meerschweinchen ohne Einfluß auf den Spiegel der freien Fettsäuren im interscapularen Fettkörper, dagegen bewirkt Kältebelastung bei 20 Tage alten in Wärme aufgezogenen Tieren einen Anstieg des Fettsäurespiegels auf etwa das Doppelte des Kontrollwertes.

Andererseits führt kurzfristige Kältebelastung in den Mitochondrien des interscapularen Fettkörpers neugeborener Meerschweinchen zu einer Verminderung des Fettsäuregehaltes auf die Hälfte des Kontrollwertes.

Diese Befunde werden im Zusammenhang mit der Bedeutung der Fettsäuren für die Atmungskontrolle und den Kopplungsgrad der oxydativen Phosphorylierung in den Mitochondrien des braunen Fettgewebes im Hinblick auf die chemische Wärmebildung des braunen Fettgewebes diskutiert.

Diskussion

=====

Nachdem in verschiedenen Laboratorien Befunde erhoben sind, die die Bedeutung der freien Fettsäuren für den Mechanismus der Chemothermogenese im multiloculären "braunen" Fettgewebe erkennen lassen (12, 17, 28), und da andererseits schon seit den Untersuchungen von FRESSMANN und LARDY (24) bekannt war, daß langkettige Fettsäuren in vitro die oxydative Phosphorylierung isolierter Mitochondrien entkoppeln können, war für die weitere Aufklärung des Mechanismus der Kälteinduzierten Chemothermogenese im multiloculären Fettgewebe und zur Integration der verschiedenen in diesem Zusammenhang erhobenen experimentellen Befunde eine Analyse des Zusammenhangs zwischen dem Spiegel langkettiger Fettsäuren im multiloculären Fettgewebe während der postnatalen Entwicklungsphase des Meerschweins und bei Kältebelastung vordringlich. Sowohl in der frühen Postnatalentwicklung, während der bei Aufzucht in Wärme das interscapulare Fettgewebe seine Fähigkeit zur erhöhten Chemothermogenese bei Kältebelastung weitgehend verliert (40), als auch bei Kälteaufzucht, wo dieser Funktionsverlust und die ihm zugrundeliegende Verdrängung der multiloculären Fettzellen durch uniloculäres "weißes" Fettgewebe unterbleibt (6), waren nach Untersuchungen aus dem Arbeitskreis von HOHORST und RAFAEL Mitochondrien isoliert worden, deren Kopplungsgrad zwischen Elektronentransport und Phosphorylierung große Unterschiede aufwies (27).

Wenn langkettige Fettsäuren für diese Unterschiede verantwortlich sind, sollten dementsprechend auch Unterschiede in den zellulären Konzentrationen unter den vorgenannten Bedingungen zu finden sein. Tatsächlich und entsprechend der Erwartung findet sich eine Verminderung des Gehalts an langkettigen (DUNCOMBE-positiven) Fettsäuren nach 3 Wochen Wärmeeufzucht im interscapularen Fettkörper von Meerschweinchen, während bei Aufzucht in der Kälte der Fettsäurespiegel auf dem Niveau unmittelbar nach der Geburt verbleibt.

Dieser Befund stimmt gut mit den früher von HULL und Mitarbeitern (16) im Blutserum von Kaninchen nach Kältebelastung gefundenen höheren Spiegeln an freien Fettsäuren überein. Im Hinblick auf den möglichen und postulierten entkoppelnden Effekt der Fettsäuren auf die Atmungskettenphosphorylierung der Mitochondrien der braunen Fettzellen scheint der gefundene Unterschied der Fettsäuregehalte in vitro an isolierten Mitochondrien aus multiloculären Fettgewebe bestimmten "kritischen" Konzentrationen an langkettigen Fettsäuren, bei denen die Atmung maximal stimuliert wird (28) zu entsprechen.

Letztere wurden für Oleat und Palmitat in Gegenwart von 2 % Albumin mit etwa 1,4 $\mu\text{Mol/ml}$ Inkubat ermittelt (SAFARI, LUDOLPH et al. und LUDOLPH, Dissertation). Jedoch ist bei einer derartigen Übertragung von in vitro gewonnenen quantitativen Daten auf die in vivo-Verhältnisse Vorsicht angebracht, da die für Albumin bestimmte Bindungskapazität für langkettige Fettsäuren mit der der Proteine des Fettzellcytoplasmas kaum übereinstimmen dürfte. Außerdem wird dabei das Problem der Kompartimentierung der Fettsäuren in der Fettzelle vernachlässigt, was sicher eine unzulässige Vereinfachung darstellt, wenn man das Problem, wie extramitochondriale langkettige Fettsäuren, die aus der Lipolyse der Triglyceriddepots im Cytosol freigesetzt werden, die Atmungskettenphosphorylierung in den Mitochondrien der Fettzellen beeinflussen, in Betracht zieht. So haben Untersuchungen über die Rekonstitutionswirkung von Guanosinnukleotiden auf die durch langkettige Fettsäuren entkoppelte Atmungskettenphosphorylierung in Mitochondrien aus braunem Fett wahrscheinlich gemacht, daß für den Entkopplungsmechanismus nicht die an der Außenfläche der Mitochondrien adsorbierten und einen möglichen Detergenzeffekt entfaltenden freien Fettsäuren, sondern intramitochondriale Fettsäuren verantwortlich sind (28). Auch der Befund, daß bei den aus dem interscapularen Fett nach kurzfristiger Kältebelastung isolierten Mitochondrien der Fettsäuregehalt auf rund die Hälfte des Wertes nicht Kältebelasteter Kontrollen vermindert ist, kann aus den oben genannten Gründen nur mit Vorsicht als Folge einer stärkeren Veratmung intramitochondrialer Fettsäuren unter diesen Bedingungen interpretiert werden, zumal Absorptionseffekte nicht völlig ausgeschlossen erscheinen.

Vorläufige Untersuchungen in unserem Arbeitskreis (Albring et al., unveröffentlicht) an isolierten multiloculären Fettzellen und ihren Mitochondrien sprechen vielmehr für eine Koinzidenz zwischen Atmungssteigerung und Anstieg des intramitochondrialen Fettsäurespiegels.

Erst weitere Versuche werden hier Klarheit bringen können.

Literatur

=====

- 1) BORST, P., L. A. LOOS, E. J. CHRIST und E. C. GLATER
Uncoupling activity of free fatty acids
Biochem. Biophys. Acta 62, 509 (1962)
- 2) BRÜCK, K.
Temperature regulation in the newborn infant
Biol. Neonat. (Basel) 3, 65 (1961)
- 3) BRÜCK, K. und B. W. WÜNNENBERG
Über die Modi der Thermogenese beim neugeborenen
Meerschweinchen
Pflügers Arch. d. ges. Physiol. 282, 362 (1965)
- 4) BRÜCK, K. und B. W. WÜNNENBERG
Beziehung zwischen Thermogenese im "braunen"
Fettgewebe, Temperatur im cervicalen Anteil des
Vertebralkanals und Kältezittern
Pflügers Arch. ges. Physiol. 290, 167 (1966)
- 5) BRÜCK, K.
Die Funktion des "braunen" Fettgewebes beim Neu-
geborenen
In: Fortschritte der Pädiatrie Bd. 2,
Hrsg: F. LINNEWIEH, Berlin, Heidelberg,
New York: Springer 1967
- 6) BRÜCK, K.
Die Bedeutung des "braunen" Fettgewebes für die
Temperaturregelung des neugeborenen und kälte-
adaptierten Säugers
Naturwiss. 64, 156 (1967)

- 7) CHENG, A. L. S. und D. B. ZILVERSMIT

Phospholipidadsorption an Zeolite

J. Lipid Research 1, 190 (1960)

- 8) CHRISTIANSEN, E. N., J. I. PEDERSEN und H. J. GRAV

Uncoupling and recoupling of oxidative phosphorylation in brown adipose tissue mitochondria

Nature 219, 857 (1969)

- 9) DERRY, D. M., E. SCHÖNBAUM und G. Steiner

Two sympathetic nerve supplies to brown adipose tissue of the rat

Can. J. Physiol. Pharmacol., 47, 57 (1969)

- 10) DITTLER und LESTER

In: ROBERT, C. und S. FLEISCHER

Isolation, Charakterization, and Determination of polar lipids of mitochondria

In: Methods in Enzymology, Volume X.
Oxidation and Phosphorylation

Edit. by R. W. LESTERBROOK und M. E. PULLMAN
Academic Press New York und London S. 385 - 406 (1967)

- 11) DOLE, V. P. und H. MEINERTZ

J. Biol. Chem. 235, 1595 (1960)

- 12) DRAHOTA, Z., E. HONOVA und P. HAHN

The effect of ATP and Carnitine on the endogenous respiration of mitochondria from brown adipose tissue

Experientia 24, 431 (1968)

- 13) DUNCOMBE, W. G.

The colorimetric micro-determination of
long-chain fatty acids

Biochem. J. 88, 7 (1963)

- 14) ESTABROOK, R. W.

In: Methods in Enzymology, Volume X.
Oxydation and Phosphorylation

Edit. by R. W. ESTABROOK and M. M. FULLMAN
Academic Press New York and London S. 41 (1967)

- 15) GUILLORY, R. J. und E. RACKER

Oxidative phosphorylation in brown adipose
mitochondria

Biochem. Biophys. Acta 153, 490 (1968)

- 16) HARMANN, M. J. und D. HULL

J. Physiol. (London) 201, 685 (1969)

- 17) HITTELMAN, K. J., B. CANNON und O. LINDBERG

Oxidative phosphorylation and compartmentation
of fatty acid metabolism in brown fat mitochondria

European J. Biochem. 11, 183 (1969)

- 18) HOHORST, H. J. und J. RAFAEL

Oxydative Phosphorylierung durch Mitochondrien
aus braunem Fett

Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 349, 268 (1968)

- 19) KELLEY, T. F.

Separation with uni-dimensional TLC of all
neutral lipid classes

J. chromatog. 22, 456 (1966)

- 20) LANGDON, R. G.

In lipide metabolisme

Edit. by K. Bloch, 231 (John Wiley, New York, 1960)

- 21) LINDBERG, O., J. de PIERRE, E. RYLANDER and B. A. AFZELIUS

Studies of the mitochondrial energy-transfer system of brown adipose tissue

J. Cell. Biol. 34, 293 (1967)

- 22) LINDBERG, O.

Brown adipose tissue

American Elsevier Publishing Company, INC.
New York 1970

- 23) PEDERSEN, J. I., E. N. CHRISTIANSEN, H. J. GRAV, W. DELINGSBY
und R. FABRICIUS

Respiration linked phosphorylation in mitochondria of guinea pig brown fat

Biochem. Biophys. Res. Com. 32 (3), 492 (1968)

- 24) PRESSMANN, B. C. und H. A. LARDY

Further studies on the potassium requirements of mitochondria

Biochem. Biophys. Acta 18, 482 (1955)

- 25) PRESSMANN, B. C. und H. A. LARDY

Surface active agents and mitochondria ATase

Biochem. Biophys. Acta 21, 458 (1956)

- 26) PRUSINER, S. und M. FOE

Thermodynamic considerations of mammalian thermogenesis

Nature 220, 235 (1968)

- 27) RAFAEL, J., D. KLAAS und H. J. HOHORST

Mitochondrien aus braunem Fettgewebe:
Enzyme und Atmungsketten-Phosphorylierung während
der prä- und postnatalen Entwicklung des inter-
scapularen Fettkörpers des Meerschweinchens

Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 349, 1711 (1968)

- 28) RAFAEL, J., H. J. LUDOLPH und H. J. HOHORST

Mitochondrien aus braunem Fettgewebe:
Entkopplung der Atmungsketten-Phosphorylierung durch
langkettige Fettsäuren und Rekopplung durch
Guanosintriphosphat

Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 350, 1121 (1969)

- 29) RAFAEL, J., M. HÜSCH, D. STRATMANN und H. J. HOHORST

Mitochondrien aus braunem und weißem Fett:
Struktur, Enzymprofil und oxydative Phosphorylierung

Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 351, 1513 (1970)

- 30) RASMUSSEN, A. T.

The so-called hibernating gland

J. Morphol. 38, 147 (1923/24)

- 31) REED, N. und J. N. FAIN

Stimulation of respiration in brown fat cells
by epinephrine, dibutyryl - 3' 5' adenosine
monophosphate and carbonyl cyanide m.-chloro-
phenylhydrazine

J. Biol. Chem. 243 (11), 2841 (1968)

- 32) ROUSER, G. und S. FLEISCHER

Isolation Charakterization and Determination of
Polar Lipids of Mitochondria

In: Methods in Enzymology, Volume X. Oxidation
and Phosphorylation

Edit. by R. W. ESTABROOK und M. E. PULLMAN
Academic Press New York and London S. 385 - 406 (1967)

- 33) SMITH, R. E., J. C. ROBERTS und K. J. MITTELMAN
Nonphosphorylating respiration of mitochondria
from brown adipose tissue of rats
Science 154, 653 (1966)
- 34) SMITH, R. E., B. A. HORWITZ
Brown fat and thermogenesis
Phys. Rev. 47, 150 (1967)
- 35) STAHL, E.
Geräte und allgemeine Techniken der DC
In: Dünnschichtchromatographie
Hrsg. E. Stahl, Berlin, Heidelberg, New York
Springer (1967) S. 53 - 85
- 36) STRAUMANN, D. und H. J. HOHORST
Abstract
IV FEBS Meeting Oslo 1967
- 37) Sutherland, E. W., G. A. ROBISON und R. W. BUTCHER
Circulation 37, 279 (1968)
- 38) WEICHELBAUM, T. E.
Amer. J. Clin. Path. Techn. Sec. 10, 40 (1946)
- 39) WEINBACH, E. C. und J. Garbus
Mechanism of action of reagents that
uncouple oxidative phosphorylation
Nature, 221/5185, 1016 (1969)

40) ZEISSBERGER, E., K. BRÜCK, W. WÜNNENBERG und C. WIETASCH

Das Ausmaß der zitterfreien Thermogenese des
Meerschweinchens in Abhängigkeit vom Lebens-
alter

Pflügers Archiv 296, 276 (1967)

Lebenslauf
=====

Am 4. 12. 1946 wurde ich als fünftes Kind des Dipl. Landwirts Albert Hennemann und dessen Ehefrau Elise geb. Ohlhausen in Bad Hersfeld geboren.

Von 1953 bis 1957 besuchte ich die Volksschule in Breitenbach bei Bebra, danach das Gymnasium in Rotenburg a. d. Fulda bis zum Abitur im Februar 1966.

Im Sommersemester 1966 begann ich das Medizinstudium an der Philipps-Universität Marburg a.d.Lahn, an der ich am 15. 3. 1967 die naturwissenschaftliche, am 30. 9. 1968 die Ärztliche Vorprüfung und am 18. 1. 1972 das Staatsexamen bestand.

Während der ersten vier klinischen Semester arbeitete ich bei Herrn Prof. Dr. Dr. Hohorst im Physiol.-Chem. Institut der Universität Marburg an der vorliegenden Dissertation.

Nach der Verheiratung mit Herrn Dr. med. Jürgen Schott zogen wir nach Berlin um, wo ich seit dem 15. 2. 1972 als Medizinalassistentin im Tumor- bzw. Gehirntumorzentrum auf der Inneren Abteilung tätig bin.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren
und Dozenten:

Beckmann, Berendes, Bommer, Brück, Buchholz, Dimroth, Dölle,
Exner, Friedrich, Graul, Hamm, Hamelmann, Hardewig, Hensel, Heuser,
Hildebrandt, Hohorst, Hort, Jakob, Karlson, Koranzki, Korb, Kreutz,
Linneweh, Madelung, Mahr, Mann, Martini, Mattes, du Mesnil de Rochemont,
Meyer-Berthenrath, Milbradt, Petry, Pots, Reim, Rodeck, Rohen, Schiff,
Schleyer, Schmid, Schmitz-Moormann, Seidel, Siegert, v. Stosch, Straub,
Strohmeyer, Voss, Walcher, Wendt, Zilliken

Ich erkläre ehrenwörtlich, daß ich die der Medizinischen Fakultät Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel

"Fettsäurespiegel im braunen Fett des Meerschweins während der frühen Postnatalentwicklung und bei Kältebelastung"

in dem Physiol.-Chem. Institut der Universität Marburg a. d. Lahn unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr. H. J. Hohorst ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Durchführung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- und ausländischen Medizinischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Meinen verehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. Dr.
H. J. Hohorst, möchte ich für seine Ermutigungen,
seine Geduld und Freundlichkeit und seine Hilfe
herzlich danken.

Unseren Tierpfleger, Herrn Block, gebührt mein auf-
richtiger Dank für die prompte Bereitstellung und
sorgfältige Pflege der Tiere sowie seine Hilfe beim
Betäuben und Töten der Meerschweinchen.

Herrn Professor Dr. H. Kaffarnik danke ich für die
Übernahme des Correferates.

